

Клиническая морфология

УДК 611.018.13

Аребьев Э.В.

ВОЗМОЖНОСТЬ АНАЛИЗА ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

Arebyev E.V.

POSSIBILITY OF ANALYSIS OF THE PHASES OF THE CELLULAR CYCLE IN TUMOR CELLS OF BREAST CANCER USING IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD

Department of histology, cytology and embryology
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation
E-mail: earebyev@gmail.com

Аннотация. Ki67 является общепризнанным и широко используемым маркером пролиферации, напрямую связанным с делением клетки. В G1-фазе клеточного цикла происходит падение его уровня, сменяющееся постепенным возрастанием в ходе фазы S и достижением максимума к следующему митозу. Экспрессия Ki67 помогает выявить опухолевые клетки в активной фазе клеточного цикла (G1-, S-, G2- и M-фазы). При иммуногистохимическом выявлении Ki67 ядра опухолевых клеток в пролиферации окрашиваются в коричневый цвет, появляется возможность посчитать их количество. При морфометрическом исследовании можно выявить размеры (площадь) ядер опухолевых клеток, не входящих в пролиферирующую фракцию – клетки в G₀ периоде цикла, содержащие двойной набор хромосом (фракция 2c2n клеток). Появляется возможность рассчитать размеры (площади) ядер клеток в S-периоде (с содержанием ДНК/хромосом 2c-4c:2n4n) и в G₂ – периоде (с содержанием ДНК/хромосом 4c4n) и установить их количество используя гистограмму распределения ядер опухолевых клеток.

Annotation. Ki67 is a recognized and widely used proliferation marker directly associated with cell division. In the G1 phase of the cell cycle, its level falls, alternating with a gradual increase during phase S and reaching the maximum for the next mitosis. Ki67 expression helps identify tumor cells in the active phase of the cell cycle (G1-, S- G2- and M-phases). When immunohistochemical detection of Ki67, the nuclei of tumor cells in the proliferation are stained brown, it is possible to count

their number. In a morphometric study, it is possible to identify the size (area) of the nuclei of tumor cells that are not part of the proliferating fraction — cells in G_0 during the cycle period, containing a double set of chromosomes (fraction $2c2n$ cells). It is possible to calculate the sizes (areas) of cell nuclei in the S-period (with DNA content $2c-4c$: $2n4n$) and in the G_2 period (with DNA content $4c4n$) and set their number using the histogram of the distribution of the nuclei of tumor cells.

Ключевые слова: Ki67, иммуногистохимия, клеточный цикл, периоды цикла

Key words: Ki67, immunohistochemistry, cell cycle, cycle periods

Введение

В настоящее время принято разделять весь клеточный цикл на митоз (фазу, когда хромосомы находятся в компактном конденсированном и неактивном состоянии) и интерфазу (фазу между делениями, когда хромосомы деконденсированы и транскрипционно активны). В интерфазе выделяет три ключевых фазы: G_1 (рост клетки, подготовка ДНК к репликации, — клетка имеет диплоидный набор хромосом), S (репликация ДНК), G_2 (рост клетки, подготовка к митозу, — клетка имеет тетраплоидный набор хромосом). Для определения доли клеток, находящихся в клеточном цикле, т. е. совокупности всех клеток за исключением клеток в G_0 , принято использовать термины «фракция роста» или «пролиферативный пул». Фаза митоза клеточного цикла является на данный момент достаточно методически изученной, тогда как интерфаза клеточного цикла требует более детального изучения для выявления закономерности морфофункциональных изменений клеток [1].

Ki67 является общепризнанным и широко используемым маркером пролиферации, напрямую связанным с делением клетки. Он представлен двумя различными формами с молекулярной массой 320 и 359 кДа, кодирующий ген локализуется на 10-й хромосоме и состоит из 15 экзонов. В процессе митоза белок в основном связан с хромосомами, в интерфазе выявляется преимущественно в ядрышках. Максимальный уровень белка Ki67 в клетке регистрируется в митозе. В G_1 -фазе клеточного цикла происходит падение его уровня, сменяющееся постепенным возрастанием в ходе фазы S и достижением максимума к следующему митозу. Экспрессия Ki67 помогает выявить раковые клетки в активной фазе клеточного цикла (G_1 -, S-, G_2 - и M-фазы). Только в период G_0 отсутствует Ki67 [2, 3].

Цель исследования — показать возможность анализа фаз клеточного цикла с использованием иммуногистохимического выявления Ki67 в ядрах опухолевых клеток у пациенток с раком молочной железы.

Материалы и методы исследования

Иммуногистохимические исследования (ИГХ) проводили на парафиновых срезах. Демаскировка антигенов происходила путем инкубации срезов в течение 20 мин в ретривере при температуре 120°C в растворе 0,01 М цитратного буфера ($\text{pH}=6,0$). Эндогенную пероксидазу блокировали при обработке срезов в течение 10 мин в 3% перекиси водорода. Инкубация с

первичными антителами к ядерному антигену Ki67 (клон MIB-1, «Dako») в разведении 1:400 длилась в течение 20 мин при комнатной температуре. Иммуное окрашивание проводили стрептавидин-био-тиновым пероксидазным методом («Dako», LSAB+ Kit HRP), в качестве хромогена использовали раствор 3,3-диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+). Для фонового ядерного окрашивания применяли гематоксилин. Негативный контроль осуществляли без первичных антител. В каждом случае исследовали 1000 опухолевых клеток в 6-15 полях зрения в зависимости от плотности опухоли, при увеличении $\times 400$. Определяли индекс пролиферации (ИП) Ki67 - число положительно окрашенных ядер клеток от общего количества подсчитанных клеток, в процентах [2, 4].

При иммуногистохимическом выявлении Ki67 ядра опухолевых клеток в пролиферации окрашиваются в коричневый цвет, появляется возможность посчитать их количество [2]. При морфометрическом исследовании можно выявить размеры (площадь) ядер опухолевых клеток, не входящих в пролиферирующую фракцию – клетки в G₀ периоде цикла, содержащие двойной набор хромосом (фракция 2c2n клеток) и не окрашивающиеся в коричневый цвет. Появляется возможность рассчитать размеры (площади) ядер клеток в G₁- периоде – их размер должен совпадать с размерами ядер в G₀-периоде (2c2n), S-периоде (с содержанием ДНК 2c-4c: 2n4n) и в G₂ – периоде (с содержанием ДНК 4c4n) и установить их количество используя гистограмму распределения ядер опухолевых клеток по их размерам.

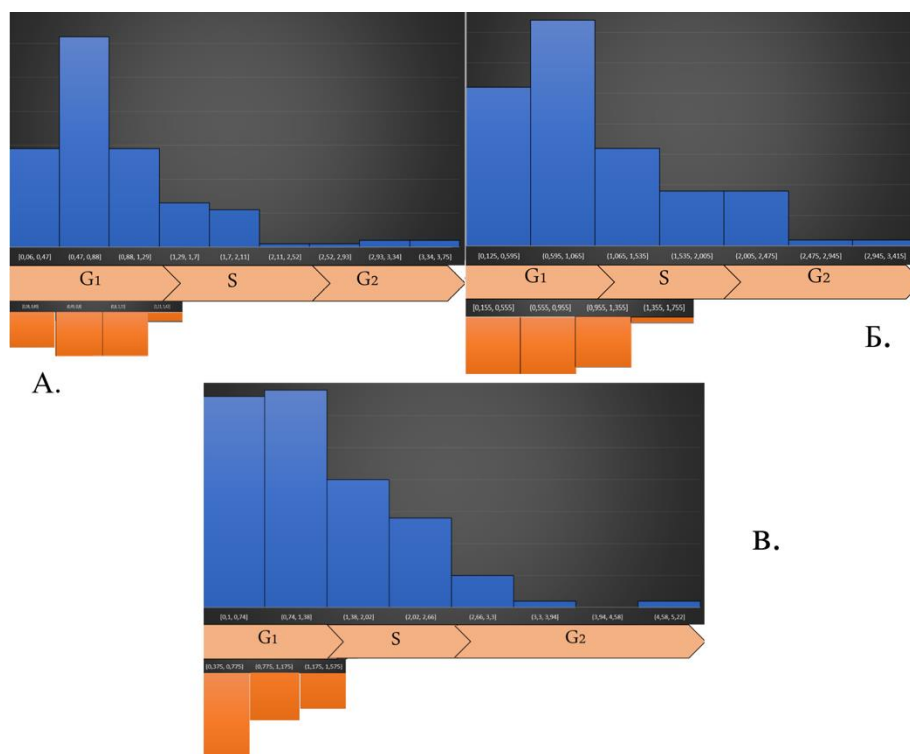
С помощью световой микроскопии было изучено 3 препарата – №891 (трижды негативный), 2507 (люминальный А) и 1800 (люминальный А). Для подсчета площади ядер пролиферирующих клеток была использована микроскопическая измерительная линейка. Всего изученных ядер – 180 в каждом препарате, из которых 150 – пролиферирующих (экспрессия Ki67) и 30 – непролиферирующих.

Результаты исследования и их обсуждение

Как показано на рис. 1а – препарат №2507 – в фазе G₁ – диплоидный набор хромосом – площадь ядер пролиферирующего пула находится в интервале от 0,06 до 1,29 мкм². Поскольку в фазе G₂ – тетраплоидный набор хромосом – площадь ядер увеличивается почти в 2 раза (1,95) и находится в интервале от 2,52 до 3,75 мкм². Оставшиеся ядра принадлежат фазе S и их площадь находится в интервале от 1,29 до 2,52 мкм². Площадь ядер непролиферирующих клеток находится в интервале от 0,18 до 1,42 мкм². Препарат №2507 содержит 25% клеток пролиферирующего пула с экспрессией Ki67, из которых 20% находятся в фазе G₁, 4,2% – в фазе S и 0,8% – в фазе G₂ (см. табл. 1).

Рисунок 1.

Гистограммы (а – препарат №2507, б – препарат №1800, в – препарат №897) распределения ядер клеток по площади (мкм²). Синим цветом выделены ядра пролиферирующих клеток, оранжевым – непролиферирующих.



На рис. 1б – препарат №1800: в фазе G_1 – диплоидный набор хромосом – площадь ядер пролиферирующего пула находится в интервале от 0,125 до 1,065 $\mu\text{м}^2$. Поскольку в фазе G_2 – тетраплоидный набор хромосом – площадь ядер увеличивается почти в 2 раза (1,88) и находится в интервале от 2,005 до 3,415 $\mu\text{м}^2$. Оставшиеся ядра принадлежат фазе S и их площадь находится в интервале от 1,065 до 2,005 $\mu\text{м}^2$. Площадь ядер непролиферирующих клеток находится в интервале от 0,155 до 1,755 $\mu\text{м}^2$. Препарат №1800 содержит 25% клеток пролиферирующего пула с экспрессией Ki67, из которых 15,9% находятся в фазе G_1 , 6,3% – в фазе S и 2,8% – в фазе G_2 (см. табл.1).

Таблица 1.

Количественные характеристики ядер опухолевых клеток (G_1 , G_2 , S – периоды клеточного цикла)

№2507: люминальный подтип	G_1		P-value
	0 (неокр), n=30	1 (окр), n=120	
Площадь ядер	1.76 [1.50, 2.08]	0.66 [0.47, 0.85]	<0.001
№2507	S		P-value
	0 (неокр), n=125	1 (окр), n=20	
Площадь ядер	0.68 [0.49, 0.94]	1.70 [1.50, 1.90]	<0.001
№2507	G_2		P-value
	0 (неокр), n=145	1 (окр), n=5	
Площадь ядер	0.75 [0.50, 1.15]	3.00 [2.94, 3.38]	<0.001
№1800: люминальный подтип	G_1		P-value
	0 (неокр), n=36	1 (окр), n=63	
Площадь ядер	1.61 [1.37, 2.06]	0.60 [0.45, 0.82]	<0.001
№1800	S		P-value
	0 (неокр), n=74	1 (окр), n=25	

Площадь ядер	0.73 [0.46, 0.94]	1.47 [1.26, 1.65]	<0.001
№1800	G2		P-value
	0 (неокр), n=88	1 (окр), n=11	
Площадь ядер	0.81 [0.50, 1.12]	2.14 [2.10, 2.41]	<0.001
№891: трижды негативный подтип	G1		P-value
	0 (неокр), n=41	1 (окр), n=67	
Площадь ядер	2.14 [1.65, 2.55]	0.75 [0.47, 1.05]	<0.001
№891	S		P-value
	0 (неокр), n=74	1 (окр), n=34	
Площадь ядер	0.78 [0.50, 1.10]	1.98 [1.63, 2.36]	<0.001
№891	G2		P-value
	0 (неокр), n=101	1 (окр), n=7	
Площадь ядер	1.05 [0.64, 1.63]	3.20 [2.73, 3.33]	<0.001

На рис. 1в – препарат №897 – фазе G₁ – диплоидный набор хромосом – площадь ядер пролиферирующего пула находится в интервале от 0,1 до 1,38 мкм². Поскольку в фазе G₂ – тетраплоидный набор хромосом – площадь ядер увеличивается почти в 2 раза (1,93) и находится в интервале от 2,66 до 5,22 мкм².

Оставшиеся ядра принадлежат фазе S и их площадь находится в интервале от 1,38 до 2,66 мкм². Площадь ядер непролиферирующих клеток находится в интервале от 0,375 до 1,575 мкм².

Препарат №891 содержит 75% клеток пролиферирующего пула с экспрессией Ki67, из которых 46,5% находятся в фазе G₁, 23,6% – в фазе S и 4,9% – в фазе G₂ (см. табл.1).

Исходя рис. 1 видно, что на препаратах №2507 и №1800 в фазе G₁ в 2 раза больше ядер, экспрессирующих Ki67, чем в фазе S. На препарате №1800 также видно, что в фазе S и на стыке фаз S и G₂ количество ядер, экспрессирующих Ki67 находится больше, чем на препарате №2507.

Если сравнить все три препарата, то можно сказать, что диапазон площади пролиферирующих ядер в фазе G₂ препарата №891 (от 2,66 и до 5,22 мкм²) значительно превышает аналогичный интервал на препаратах №2507 (от 2,52 до 3,75 мкм²) и №1800 (от 2,005 до 3,415 мкм²). Также в фазе S препарата №891 находится значительно большее количество ядер, чем в соответствующей фазе на препаратах №2507 и №1800.

Выводы

1. Показана принципиальная возможность анализа фаз клеточного цикла опухолевых клеток рака молочной железы с использованием морфометрического и иммуногистохимического (выявление экспрессии Ki67) методов исследования.

2. Показаны различия в популяции пролиферирующих клеток при разных подтипах рака молочной железы (люминальном и тройном негативном).

Список литературы

1. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М. Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата

опухолевых клеток карциномы молочной железы. Гены и клетки. 2017, 12 (4), 76-81.

2. Сазонов С.В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы / Екатеринбург, ВУМАН, 2018. - 194 с.

3. Франк Г.А. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей / Г.А. Франк, Л.Э. Завалишина, К.М. Пожарисский. – М.: Практическая медицина, 2014. – 176 с.

4. Penault-Llorca F. Ki67 assessment in breast cancer: an update// Pathology. – 2017. – Т. 49, № 2. – С. 166–171.

УДК 314.422.2

**Бабушкин Н.Д., Миняйло Е.М., ¹Шабунина-Басок Н.Р., ²Бабушкина О.В.
СТРУКТУРА ДЕТСКОЙ НЕНАСИЛЬСТВЕННОЙ СМЕРТНОСТИ
В ВОЗРАСТЕ ДО 6 МЕСЯЦЕВ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА 2016-
2017 ГОД ПО ДАННЫМ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКИХ ВСКРЫТИЙ**

¹Кафедра патологической анатомии и судебной медицины
Уральский государственный медицинский университет,

²ГБУЗ СО «Бюро судебно-медицинской экспертизы»,
Екатеринбург, Российская Федерация

**Babushkin ND, Minyaylo EM, ¹Shabunina-Basok NR, ²Babushkina OV
THE STRUCTURE OF INFANT MORTALITY UNDER 6 MONTHS OF AGE
IN THE SVERDLOVSK REGION FOR THE PERIOD 2016-2017
ACCORDING TO THE FINDINGS OF FORENSIC MEDICAL
EXAMINATION**

¹Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russian Federation

²GBUZ SO "Bureau of Forensic Medical Examination",
Ekaterinburg, Russian Federation

E-mail: Nikebabushkin@icloud.com

Аннотация. Статья содержит статистический анализ данных о структуре детской смертности на территории Свердловской области за 2016-2017 год. Анализ данных позволил выявить основные причины смерти детей до 6 месяцев. Исследование проведено на основании изучения судебно-медицинских протоколов вскрытий с использованием современных статистических методик.

Annotation. The article presents a statistical analysis of data on the structure of child mortality in the Sverdlovsk region for the period 2016-2017. Data analysis